## 腹侧黄斑小鼠的部分特征及其突变基因的染色体定位

施美莲<sup>1</sup>,徐平<sup>1,\*</sup>,殷筱舒<sup>2</sup>,杨伟伟<sup>2</sup>,顾美儿<sup>2</sup>,俞利平<sup>2</sup>,刘桂杰<sup>2</sup>,吴宝金<sup>2,\*</sup>

(1. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615; 2. 杭州师范大学 实验动物中心, 浙江 杭州 310036)

**摘要:** 腹侧黄斑小鼠(*VY<sup>Slac</sup>*)是在 B<sub>6</sub>小鼠繁殖生产过程中被发现、分离的突变系小鼠,呈单基因显性遗传,其 头颈及躯干的腹侧为黄色。*VY<sup>Slac</sup>*腹部表皮多巴(+)黑色素细胞及毛囊内黑色素较其背景品系 B<sub>6</sub>少;腹部毛发颜色 浅黄、多数无黑色素沉积,但结构正常。通过微卫星标记与 48 只 F<sub>2</sub>小鼠(*VY<sup>Slac</sup>D<sub>2</sub>F<sub>1</sub>*回交 D<sub>2</sub>)的连锁分析发现,突 变基因与 *D2Mit229* 间的 LOD 值为 5.79,确定连锁。随后,在突变基因附近反复多次筛选新的微卫星或 SNP 标记, 通过对 196 例 F<sub>2</sub>小鼠的多次连锁分析,将突变基因所在区域缩小到 *rs13476833(*距着丝粒 149 804 749 bp)与 *rs27310903*(距着丝粒 155 060 764 bp)间约 5 256 015 bp 的范围内。

关键词:腹部黄斑小鼠;表型分析;基因定位 中图分类号:Q959.837; R-332; Q344; Q954.4 文献标志码:A 文章编号:0254-5853-(2012)03-0290-08

# Phenotype analysis and mutant gene location of ventral yellow mouse (VY<sup>Slac</sup>)

SHI Mei-Lian<sup>1</sup>, XU Ping<sup>1,\*</sup>, YIN Xiao-Shu<sup>2</sup>, YANG Wei-Wei<sup>2</sup>, GU Mei-Er<sup>2</sup>, YU LI-Ping<sup>2</sup>, LIU Gui-Jie<sup>2</sup>, WU Bao-Jin<sup>2,\*</sup>

(1. Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd., Shanghai 201615, China; 2. Laboratory of Experimental Animal Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

**Abstract:** The ventri-yellow pigmentation mouse (temporarily named  $VY^{Slac}$ ) arose spontaneously in the C57BL/6J inbred mouse strain, found and bred by Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd.  $VY^{Slac}$  presented a special phenotype marked by yellow coat on the ventral surface of neck and trunk that was without melanin deposition but maintained a normal structure. The number of melanocytes in epidermis and melanin in hair follicle of the abdominal skin of the mutant mouse were less than that of their background strain, while there was no significant difference between the dorsal skins of the two strains. This mutant phenotype was inherited as single-gene dominant inheritance, confirmed by genetic experiment, and there was no significant difference between  $VY^{Slac}$  and B<sub>6</sub> for other biological parameters such as weight, anatomic and histological structures of major organs and blood physiology. When the linkage relationship between the genomic DNA samples of F<sub>2</sub> 48 mice ( $VY^{Slac}D_2F_1 \times D_2$ ) and mutant phenotype were evaluated, the mutant gene was confirmed on chromosome 2 near *D2Mit229*. New microsatellite and SNP markers were selected to amplify genomic DNA samples of 196 F<sub>2</sub> mice and the mutant gene was narrowed down to 5.3 Mb region between *rs13476833* and *rs27310903* on chromosome 2. The preliminary results of our phenotype analysis and gene location provides a solid basis for further identification of this mutant gene.

Key words: Ventral yellow mouse(VY<sup>Slac</sup>); Phenotyping; Mapping

"表型驱动"策略是后基因组时代小鼠功能基因研究基本手段之一。研究者通常针对具有特殊表型的突变系动物,通过遗传学手段定位、鉴定突变

动物特殊表型的遗传基础,进而推知突变基因的功能(Balling, 2001; Caspary, 2010; Stottmann & Beier, 2010)。从实验动物遗传学角度来说,带有突变基因

收稿日期: 2011-11-21; 接受日期: 2012-04-09

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(10140902700);国家自然科学基金项目(31071092)

<sup>\*</sup>通信作者(Corresponding authors), 徐平(1964 一), 男, 研究员, 主要研究方向: 实验动物育种保种、疾病模型等, E-mail:xuping@slaccas.com。 吴宝金(1969 一), 男, 教授, 主要研究方向: 分子遗传学与人类疾病动物模型, E-mail:baojinwu@163.com

第一作者简介:施美莲,高级畜牧师,E-mail:mlshi@slaccas.com

的突变系小鼠通常是在已经建立的近交系中,由一 次突变建立起来的。突变系小鼠与背景品系之间表 型上的差异正是由一个或少数几个突变基因的差 别导致的,代表了相关突变基因的功能(Wu et al, 2009, 2010)。众多的突变系小鼠不仅仅是功能基因 研究的好材料, 也是人类疾病模型开发的资源库, 而发现、培育具有特定表型的突变系小鼠是相关工 作的基础(Morgan et al, 2010; Wilkinson et al, 2010)。 腹侧黄斑小鼠为中科院上海实验动物中心工作人 员在 C57BL/6J 小鼠(简称 B<sub>6</sub>)正常生产繁殖过程中 发现并分离的新的突变系小鼠。该小鼠是一种非常 罕见的突变表型,表现为头颈躯干的腹侧面均为黄 色。本实验对黄斑突变系小鼠的部分生物学特征包 括皮肤不同部位的黑色素细胞及毛发进行了详细 观察,并采用遗传学手段将突变基因定位到第2号 染色体。本文通过细致的表型分析结合对突变基因 的定位鉴定,为建立相应的人类疾病模型或功能基 因研究材料打下良好的基础。

## 1 材料与方法

## 1.1 实验动物及饲养环境

腹侧黄斑小鼠, 雌鼠 40 只, 雄鼠 40 只; 成年 DBA/2(简称 D<sub>2</sub>)雌鼠 40 只, 雄鼠 40 只。BALB/c 小 鼠 3 只, 用于毛发及皮肤结构对照。实验小鼠均为 清洁级, 由杭州师范大学实验动物中心提供, 实验 动物生产许可证: SCXK(浙)2011-0048, 实验动物使 用许可证: SCXK(浙)2011-0157。动物饲养在屏障 动物房内, 温度控制在(23±2)℃, 湿度控制在 (55±5)%, 饲料采用 Co<sub>60</sub>照射, 自由采食和饮水, 定 期更换笼具、垫料(均经高温消毒), 室内照明采用 12/12 h 明暗交替。

## 1.2 皮肤切片的多巴染色、毛发镜检及主要脏器的 组织病理学研究

取7日龄腹侧黄斑小鼠、B<sub>6</sub>小鼠和 BALB/c 小 鼠的背部及腹部约 1.5 cm×0.5 cm 大小皮片, 按照 文献所介绍多巴染色步骤进行切片、染色、观察 (Gong & Zhan, 1994)。取2月龄腹侧黄斑小鼠和 B<sub>6</sub> 两种小鼠背部及腹部的被毛, 经二甲苯湿润后摊 片、中性树胶封固, 光镜下观察。取2月龄腹侧 黄斑小鼠和 B<sub>6</sub>小鼠, 解剖观察大体结构, 并取脑、 心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、睾丸附睾、 子宫卵巢等脏器组织, 常规制作石蜡切片、染色 镜检。

#### 1.3 血液生理指标测定

取 2 月龄腹侧黄斑小鼠和 B<sub>6</sub>小鼠雌雄各 10 只, 眼眶后静脉窦采血约 300 μL,置于加有抗凝剂的指 形管中,混合均匀。经血液分析仪 (美国 HEMAVET, 型号: 950)进行血常规检测。

## 1.4 遗传标记选择与定位用标本的准备

选用本实验室建立的 39 个微卫星体系作为全 基因组扫描的标记(Wu et al, 2003b),这些微卫星分 布于小鼠基因组的 19 条常染色体,在同一染色体 上的遗传距离在 30~55 cM 之间,并且在 B<sub>6</sub>及 D<sub>2</sub> 小鼠之间的差异至少在 4 bp 以上。

将腹侧黄斑小鼠与 D<sub>2</sub> 小鼠配种得到具有突变 表型的 F<sub>1</sub>代小鼠,再将 F<sub>1</sub>代小鼠回交 D<sub>2</sub>亲本品系 得到 F<sub>2</sub>代小鼠,逐个区分 F<sub>2</sub>代个体是否具有突变 表型;剪取 F<sub>2</sub>每个个体的 0.3 cm 尾尖,采用蛋白酶 K 消化、酚氯仿法提取基因组 DNA 备用。

## 1.5 PCR 扩增及连锁分析定位突变基因

PCR 扩增体系及扩增条件,依据文献(Wu et al, 2003b)进行,扩增样品经 50 V 电压电泳 1~2 h,电泳 结束后,在紫外灯下观察并记录结果。根据记录的凝 胶电泳结果分析突变表型与多态微卫星的关系(连 锁或重组)。采用计算"优势对数值(LODS)"方法将 突变基因定位于小鼠的某一对染色体上(Wu et al, 2003b)。

#### 1.6 突变基因的精细定位

在初步定位的基础上,在突变基因所在染色体的局部,逐步筛选更高密度的微卫星标记(http://www.informatics.jax.org/searches/polymorphism\_form.shtml),当没有可以选择的微卫星标记以后,在MGI数据库中筛选SNP标记(Mouse Genome Informatics: http://www.informatics.jax.org/javawi2/ servlet/WIFetch?page=snpQF),采用PCR产物直接测序的方法识别SNP标记的多态性,同时利用更多的F2小鼠进行连锁分析,将突变基因所在区域进一步缩小。测序工作委托上海生工生物工程有限公司完成。

## 1.7 突变小鼠遗传模式的确定及数据分析方法

将腹侧黄斑小鼠与同品系小鼠配种,观察记录 突变表型在后代小鼠中出现的数目及比例,将其与 单基因显性及单基因隐性等遗传模式的理论值进 行卡方检验。所有统计学处理在 SPSS11.0 及 Excel 2003 软件中完成。两组以上样本的均数比较用 One Way ANOVA 分析,用 Newman-Keuls 法处理组间均 数的两两比较。

## 2 结 果

## 2.1 腹侧黄斑小鼠遗传模式的确定及部分表型 特征

腹侧黄斑小鼠已传 7 代,黄斑表型稳定,表现 为头颈躯干腹侧面(从下颌至肛门)被覆黄色被毛, 黄色区域的边缘与正常被毛在腹侧与背侧交界区 界线清楚, 黄色小鼠前后肢肢端颜色浅淡发白(图 1)。我们将腹侧黄斑小鼠与 B<sub>6</sub> 配种, 得到的 152 只 后代中出现亲代突变表型小鼠 78 只, 且后代中未 出现与亲代不同的新表型, 将其与单基因显性遗传

模式比较得到的卡方值及 P 值分别为  $\gamma^2=0.053$ , P>

0.75(P=0.819), 确认突变基因的遗传模式为单基因 显性遗传, 外显率为 100%。



图 1 腹侧黄斑小鼠外观 Fig. 1 Appearance of VY<sup>Slac</sup>

A) 背景品系 B<sub>6</sub>小鼠, 头部及背部黑色; B) 腹侧黄斑小鼠, 整个腹侧面从下颌、颈部延伸至胸腹部均被覆黄色被毛。
 A) Background strain B<sub>6</sub> mouse, black head and black body; B) VY<sup>Slac</sup>, the entire ventral surface from the lower jaw, neck, chest to abdomen was covered by yellow coat.

7 日龄的腹侧黄斑小鼠背部皮肤组织内黑色素 细胞的数量及毛囊内黑色素含量与其背景品系 B<sub>6</sub> 小鼠相比无明显差异; B<sub>6</sub>小鼠腹部皮肤毛囊黑色素 含量较多,分布均匀,表皮内多巴(+)黑色素细胞散 在分布;而腹侧黄斑小鼠腹部皮肤表皮内多巴染色 阴性,毛囊壁多巴(+)黑色素细胞显著减少,毛发根 部可见规律排布的色素颗粒(图 2)。

腹侧黄斑小鼠背部毛发的结构及黑色素的排 列规则、致密,与 B<sub>6</sub>无明显差别,黄斑小鼠腹部毛 发明显较 B<sub>6</sub> 浅淡,与毛根部位多巴染色阳性不同, 缺乏黑色素,但结构正常;部分细小绒毛中,仍可 见规律排布、色泽浅的黑素颗粒(图 3)。

腹侧黄斑小鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、肾 上腺、胸腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢等主要脏器 的位置、色泽、形态及大体结构均未发现异常。各 主要组织脏器的石蜡切片亦未发现异常。血液生理 指标检测结果无显著性差异(数据见本刊网页补充 材料)。

## 2.2 突变基因的染色体初步定位

腹侧黄斑小鼠为 B<sub>6</sub>背景,我们采用 D<sub>2</sub> 作为定 位品系。将腹侧黄斑小鼠与 D<sub>2</sub> 交配繁殖 F<sub>1</sub>代小鼠, 再将带有黄斑表型的 F<sub>1</sub>小鼠回交 D<sub>2</sub>得到 F<sub>2</sub>代小鼠, 先后共得到 196 只 F<sub>2</sub>代小鼠,其中有黄斑表型者 97 只,表型正常者 99 只;提取这些小鼠基因组 DNA, 用于 PCR 扩增后的基因型分析。F<sub>2</sub> 代小鼠的被毛 颜色共有 4 种,除了与亲本 B<sub>6</sub>(黑色)及 D<sub>2</sub>(灰白色) 相同的被毛颜色外,还有棕色及灰色,无论是哪种 颜色,均能可靠地区分腹侧黄斑表型。将所有 F<sub>2</sub>小 鼠根据是否具有黄斑表型分成两个群体,分别编号 用于基因定位。



图 2 小鼠皮肤切片的多巴染色(×400)

Fig. 2 Slices of mouse skin with dopa staining (×400)

A) B<sub>6</sub>小鼠背部皮肤组织; B) 腹侧黄斑小鼠背部皮肤组织; C) BALB/c 小鼠背部皮肤组织; D) B<sub>6</sub>小鼠腹部皮肤组织; E) 腹侧黄斑小鼠腹部皮肤组织; F) BALB/c 小鼠腹部皮肤组织。黄色箭头指示为黑色素细胞。

A) Dorsal skin of  $B_6$  mouse; B) Dorsal skin of  $VY^{Slac}$  mouse; C) Dorsal skin of BALB/c mouse; D) Ventral skin of the  $B_6$  mouse; E) Ventral skin of  $VY^{Slac}$  mouse; F) Ventral skin of BALB/c mouse. Yellow arrows indicated melanocytes.





Fig. 3 Photograph of hair under microscopic (×400) A) B<sub>6</sub>小鼠背部被毛; B) 腹侧黄斑小鼠背部被毛; C) B<sub>6</sub>小鼠腹部被毛; D) 腹侧黄斑小鼠腹部被毛。

A) Dorsal hair from  $B_6$  mouse; B) Dorsal hair from  $VY^{Slac}$  mouse; C) Ventral hair from  $B_6$  mouse; D) Ventral hair from  $VY^{Slac}$  mouse.

对突变基因所在染色体的定位,是通过运用本 实验室先前建立的微卫星体系将腹侧黄斑小鼠突 变基因进行连锁分析。先将 48 个 F<sub>2</sub> 鼠尾的 DNA 标本用 39 个微卫星组成的标记系统逐一扩增,由 于微卫星是共显性标记,分析  $F_2$ 检测结果,把有腹 侧黄斑表型同时伴  $B_6$ 及  $D_2$ 微卫星标记及无腹侧黄 斑表型同时伴有  $D_2$ 微卫星标记的标本算为亲本组 合数,反之作为重组合记数(图 4)。计算各个微卫星 与突变基因在实际重组率情况下的 LOD 值。 D2Mit229与突变表型的 LOD 值为 5.79,确定与腹 侧黄斑突变基因连锁(表 1)。小鼠第 2 号染色体全长 117 cM, D2Mit249位于距着丝粒 47.5 cM 处,与突 变基因的重组率约为 26.1%,遗传距离是 26.1 cM; 而 D2Mit229距着丝粒 99 cM,与突变基因的重组率 约为 14.6%,遗传距离是 14.6 cM,故推定突变基因 位于 D2Mit249与D2Mit229之间距着丝粒约 78 cM 附近(图 5①)。

## 2.3 突变基因的精确定位

在突变基因初步定位于 *D2Mit249*(47.5 cM)与 *D2Mit229*(99.0 cM)之间距着丝粒约 78 cM 的基础 上,课题组在突变基因附近筛选了 *D2Mit62*(65 cM) 及 *D2Mit311*(83.1 cM)标记。用上述微卫星对 48 例 腹侧黄色被毛小鼠 F<sub>2</sub>代进行了基因型的检测,结果 发现突变基因与 *D2Mit62* 有 7 例发生交换,与 *D2Mit311* 间有 4 例交换,而 *D2Mit62* 和 *D2Mit311* 

衣I 个问做卫生与废例再班天受举囚的注锁刀机结束							
Tab. 1Linkage analysis results of different markers and VY							
微卫星名称 Microsatellite	微卫星位置 (染色体, 距着丝点距离)(cM) Position of microsatellites (chromosome, distance from centromere)	检测的 F <sub>2</sub> 数量 Number of F <sub>2</sub> detected	重组比 <sup>(a)</sup> (亲组合:重组合) Recombination ratio (parental combination: recombinant)	LODS 值 (按实际重组率计算) LODS (At actual recombination ratio)	是否连锁 Linkage or not		
D8Mit4	8, 14	45	29:16	0.237			
D8Mit320	8, 59	45	26:19	0.043			
D2Mit293	2, 10	46	31:15	1.23			
D2Mit249	2, 47.5	46	34:12	2.38			
D2Mit229	2, 99	48	41:7	5.79	确定连锁		

て同愛力自た喧劇共成の赤其国的大部八相休田 ± .

<sup>(a)</sup> 亲组合与重组合的计算方法,以突变基因与 D2Mit249 连锁分析为例,见表 2 及图 4。

As an example of calculation method of parental combination and recombination, the course of linkage analysis between mutation gene and D2Mit249 is shown in Tab. 2 and Fig. 4.

	表 2	腹侧黄色被毛突变基因与 D2Mit249 的连锁分析
. 2	Deta	iled data of linkage analysis between VY <sup>Stac</sup> and D2Mit249

	互交亲本 Crossing parents		测交亲本 Back-crossing parents		F <sub>2</sub> 表型及数目 Number and phenotypes of F			重组值	
	B <sub>6</sub>	$D_2$	$F_1$	<b>D</b> <sub>2</sub>	亲约 Parental co	组合 ombination	重约 Recom	且合 ibinant	score
基因型 Genotype	<u>m þó</u> + bó	+ d2 + d2	<u>m þó</u> + d2	+ 42 + 42	$\frac{m}{+}$ $\frac{b6}{d2}$	$\frac{+ d2}{+ d2}$	$\frac{m}{+}\frac{d2}{d2}$	+ <u>b6</u> + d2	
					22	12	4	8	12/46

m 为突变基因, +为野生型, b6 为 B6 型 D2Mit249, d2 为 D2 型 D2Mit249.

Tab

m indicates mutation gene; + indicates wild type; b6 is the D2Mit249 of B<sub>6</sub> and d2 is the D2Mit249 of D<sub>2</sub>.



#### 图 4 D2Mit249 对腹侧黄斑小鼠 F2检测结果

#### Fig. 4 Electrophoresis photographs detected by D2Mit249

上排第 24 泳道为 F1 对照, 上排第 1~12、15、16、21~23 泳道为具有黄斑表型 F2, 其余为无表型 F2, 其中第 1、7、12、19、20 泳道重组, 其余连锁; 下排第1~6、22~24 泳道检测对象为具黄斑表型的F2,其余均为无表型F2,其中第10、12、14、18、20、21、24 泳道重组,第3 泳道显示基因型为 B6纯合型,原因不明,第7泳道扩增失败,其余泳道均为连锁。

Upper: Lane 24 was the control of F1 mouse; lane 1 to 12, 15, 16 and 21 to 24 were F2 mice with mutant phenotype, and other lanes were wild F2 mice. Lanes 1, 7, 12, 19 and 20 showed linkage, and others showed recombination.

Lower: Lane 1 to 6 and 22 to24 were from F2 mice with mutant phenotype, and other lanes were wild F2 mice. Lanes 10, 12, 14, 18, 20, 21 and 24 showed linkage, and others showed recombination except lane 7, which failed to be amplified and lane 3, which showed B6 homozygote for unknown reasons.

之间有 10 例交换。经分析, 突变基因介于 D2Mit62 和 D2Mit311 之间(图 5②)。我们在这个区域内再次 筛选微卫星标记 D2Mit17(69 cM)及 D2Mit310 (77.6 cM), 并对 92 只 F2 小鼠(其中具有腹侧黄色被毛表 型者 47 只, 无腹侧黄色被毛表型者 45 只)进行连锁 分析,发现突变基因与 D2Mit17 有 14 例交换,与 D2Mit310 间有 7 例交换, 而 D2Mit17 和 D2Mit310 之间有 18 例交换,分析后确定突变基因介于两微 卫星之间(图 5③)。随后我们继续上述工作,在 D2Mit17 和 D2Mit310 之间的区域筛选并得到 2 个

有效微卫星标记: D2Mit304(73 cM)及 D2Mit307(74.9 cM), 分别扩增 92 个样本发现: 突变 基因与 D2Mit304 有 12 例交换, 与 D2Mit307 有 10 例, 而 D2Mit304 和 D2Mit307 之间有 2 例交换。经 连锁分析计算,突变基因不在 D2Mit304 和 D2Mit307之间,而在D2Mit307下游远离着丝粒处。 在对 D2Mit307 和 D2Mit310 进行连锁分析后, 我们 将突变基因位置缩小到 D2Mit307 和 D2Mit310 之间, 即距着丝粒 74.9~77.6 cM 范围内, 分析结果见图 5  $(4)_{a}$ 



图 5 腹侧黄色被毛小鼠突变基因定位过程 Fig. 5 Mapping process of *VY*<sup>Slac</sup> mutant gene

竖线示第 2 号染色体, 竖线左侧为各遗传标记及各标记间已检测出来的发生交换标本数目, 右侧是各标记相应距离着丝粒的遗传距离或物理距离, M 表示待定位的黄斑突变位点。

The left side of each chromosome shows the mutant gene, markers and their recombinant ratio between different sites. The right shows the position. M indicates the mutant gene.

为了进一步缩小定位范围,需要再选取新的基因组标记进行连锁分析。在 D2Mit307 和 D2Mit310之间 2.7 cM 范围内已没有合适的微卫星位点的情况下,我们先后从 20 个 SNP 标记中筛选到 5 个可用标记,扩增 SNP 标记的设计引物及多态性见表3。利用这 5 个 SNP 对 196 个 F<sub>2</sub> 小鼠 DNA 样本进行连锁分析:突变基因与 rs33521370 和 rs29860819之间均未发生交换,突变基因与 rs27310903 间仅有1 例发生交换,与间有 4 例交换, rs13476833 与

*rs27310903* 间发生交换的有 5 例,最终突变基因被 定位于 *rs13476833* 与 *rs27310903* 之间距着丝粒 149 804749 bp 到 155 060 764 bp 间大约 5 256 015 bp 范 围内,分析结果见图 5 ⑤。

## 3 讨 论

## 3.1 关于黄斑小鼠的表型特征

对突变系小鼠进行必要的表型分析是深化研究、突变基因鉴定及模型开发的工作基础。VY<sup>Slac</sup>

标记名称	引物序列	标记多	态性
Marker	Primer(5'-3')	(B <sub>6</sub> /D <sub>2</sub> )Polymo	orphism (bp)
D2Mit62	F: GGATACCGTTTGGAAAGTAAACC	162/146	_
D2Mit17	F: AGGCAATTACAAGGCCTGG R: CACCCATCTCCCTCAGTCAT	205 /220	—
D2Mit304	F: AAGCAGGTGTCGCTGATTG R: AGAAGATGGACCGAGGGG	120 /186	—
D2Mit307	F: AGTTCCAGGGAATGAAACACC R: ACACCTCTGCCAACAGTGC	150 /156	_
D2Mit310	F: TTTAAATGAAGAATAAGGTCAGAAACA R: GCATTAATTCTCATTCTCAATAATGG	138 /126	—
D2Mit311	F: ACAGGCAGCCTTCCCTTC R: TCTGTCCCGCTTCTGTTTCT	128 /108	—
rs13476833	F: GTCACACCAACCCCAGAGATTAC R: GTCCGTTCAGAGGCTTGTGC	_	G/A
rs33521370	F: TGCCCATCACATTTCCATTCA R: CCTCCTTCTCCCTCTTCCACAA	_	T/A
rs29860819	F: CCGGGTACAGATATGGGGGAAAAC R: GGGCTGCCTAGGAGAATGAAATA	_	C/T
rs27310903	F: AGAAATCCTGAATGCTGGTGTTA R: AAAAGGATGTACTGGGCTGAGGA	_	C/T
rs3698553	F: AGAGACAAGGGCAGATAAATA R: CCTTGAGATGGTGCGTGACA	_	C/T

表 3 微卫星或 SNP 引物序列以及标记的多态性 Tab. 3 Primer sequence and polymorphism of markers

小鼠腹部表皮及毛囊内多巴(+)黑色素细胞较其背 景品系 B<sub>6</sub>少,毛发镜检可见腹部毛发颜色浅黄、多 数毛发无黑色素沉积,但结构正常。本实验采用多 巴染色鉴别含黑素小体的成熟黑色素细胞, 观察结 果不能代表黑色素细胞的实际数量,但能够反映 VY<sup>Slac</sup>小鼠黑色素细胞合成黑素的功能(Spritz et al, 2003)。黑素合成发生在黑素细胞中,这种细胞来自 神经嵴, 大致经历了神经嵴细胞、黑素母细胞和黑 素细胞三个发育阶段。黑素是一种生物多聚体, 它 广泛存在于人和动物皮肤、毛发和眼睛中。动物黑 素可分为两类:一是真黑素,不含硫原子,呈棕色 或黑色; 二是脱黑素, 含硫原子, 呈黄色或微红棕 色。动物与人的皮肤及毛发色素沉着决定于其所含 真黑素与脱黑素的相对量(Hornyak, 2006; Price & Fischer, 2001)。真黑素与脱黑素间的比例由多种不 同的因素所调控,包括色素酶的表达、酪氨酸和细 胞内包含巯基的还原剂的生物利用度。Agouti、 Pomc 和 Extension 等基因参与了调节过程,其中小 鼠的 agouti 位点位于 2 号染色体, 其编码一种旁分 泌信号分子(agouti signal protein, ASP), 可使毛囊黑 素细胞合成脱黑素而不是真黑素。agouti 基因的表 达会引起脱黑素的产生, 不表达时则引起真黑素的 产生,其对真黑素和脱黑素之间转换的作用仅局限 于皮肤,而体内其他部位的黑素细胞及控制眼色的 色素细胞不受影响(Matsunaga et al, 2000)。VYSlac小 鼠黄斑腹部黄斑的形成机制与黑色素细胞缺乏 相关还是与黑色合成比例相关, 尚需进一步明确。 但现有资料显示,如果是黑素细胞的迁徙问题,如 Kit 基因突变导致的黑色素细胞迁徙问题通常导致 腹部被毛颜色白化, 而腹侧黄斑形成最大的可能 性不在于黑色素细胞的缺失, 而是黑色素合成 障碍。

腹侧黄斑是突变系小鼠的外在表现,这种小鼠 是否同时伴有其他具有疾病特征的表型呢?我们 在检索小鼠表型组数据库(http://phenome.jax.org)时, 发现有1 例突变小鼠与 VY<sup>Slac</sup> 腹侧黄斑小鼠表型相 似(http://phenome.jax.org/db/q?rtn=strains/details& strainid=1),这种小鼠的胼胝体缺失,而且海马连合 严重萎缩,在行为上表现为自闭症(Wahlsten et al, 2003; Scattoni, 2008)。但是我们对 VY<sup>Slac</sup> 小鼠的胼胝 体及海马连合处进行解剖观察,未见缺失或缩小。 另有研究表明, 腹侧黄斑相关基因如 agouti 表达异 常,不仅仅会导致皮肤毛发的色素变化,还与动物 与环境的适应性进化(Manceau et al, 2011)及血糖水 平密切相关(Overton & Leibel, 2011)。我们也发现了 VY<sup>Slac</sup> 小鼠血糖水平不稳定(资料未显示),正对其进 行深入细致的检测分析。

## 3.2 腹侧黄斑的定位与候选基因

与通过 FISH 法定位特定基因组序列不同(Liu et al, 2008),通过连锁分析进行突变基因定位是 遗传学的基本手段,由于小鼠基因组标记十分丰 富,这一工作比较方便,但必要的表型分析及小鼠 表型组数据库的充分利用对于提高突变基因定位 的效率特别有帮助。腹侧黄色被毛是一种稀有表型,

在对其定位之前,我们通过小鼠表型组数据库, 发现 *BTBR T+tf/J* 小鼠与 *VY<sup>Slac</sup>* 小鼠具有相似的表 型,且相关的突变基因位于第 2、第 8 号及第 17 号 染色体上(http://phenome.jax.org/db/q?rtn=strains/det ails&strainid=1),因此,我们优先使用这三条染色体 上的微卫星标记进行连锁分析,在扫描第 2 号染色 体时就将突变基因成功定位。这样的定位策略大幅 度减少了工作量,提高了工作效率。尽管在定位过 程中进行了反复多次的标记筛选,通过 196 只 F<sub>2</sub> 小 鼠很快就将突变基因所在区域缩小到 *rs13476833* (距着丝粒 149 804 749 bp)与 *rs27310903* (距着丝 粒 155 060 764 bp)之间约 5 256 015 bp 的范 围内。

由于 agouti 基因与黄斑表型的密切联系, 加上 黄斑基因被定位在 agouti 附近 (http://www. informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=ma rkerDetail&key=3, Chr2:154617138-154876748 bp), 我们以agouti为候选基因,做了多次mRNA的测序 工作, 但一直未能鉴定出突变碱基, 尽管如此, 我 们仍然怀疑是该基因突变导致了小鼠腹侧黄斑的 生成。由于,目前定位的区间略大,5.3 Mb 范围内尚 有 157 个基因, 认定 agouti 为突变基因尚有一定风 险, 课题组将进一步繁殖 F2 小鼠到 600 只以上, 利 用更高密度的 SNP 标记将突变基因定位到 50 万碱 基以内,这样鉴定突变基因的可靠性会更高。如果 确认 agouti 不是基因突变, 这一小鼠将有极大的科 学价值,因为到目前为止,除 agouti 基因以外,在 突变基因的定位区间内, 尚未发现其他基因与腹侧 黄斑形成有关,即便是 agouti 基因突变,极可能是 agouti 基因的一个新等位基因, 对研究 agouti 基因 的功能也有一定意义。本文结果对进一步精细定位 并鉴定黄斑突变基因奠定了良好的基础。

## 参考文献:

- Balling R. 2001. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice [J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2: 463-492.
- Caspary T. 2010. Phenotype-driven mouse ENU mutagenesis screens [J]. Methods Enzymol, 477: 313-327.
- Gong ZJ, Zhan RZ. 1994. Pathological Production and Staining Techniques [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishing House. [龚志锦, 詹镕洲. 1994. 病理组织制片和染色技术 [M]. 上海:上 海科学技术出版社.]
- Hornyak TJ. 2006. The developmental biology of melanocytes and its application to understanding human congenital disorders of pigmentation [J]. Adv Dermatol, 22: 201-218.
- Liu Y, Nie WH, Huang L, Wang JH, Su WT, Lin CC, Yang FT. 2008. Cloning, characterization, and FISH mapping of four satellite DNAs from black muntjac (Muntiacus crinifrons) and Fea's muntjac (M. feae) [J]. *Zool Res*, 29 (3): 225-235. [刘 妍, 佴文惠, 黄 玲, 王金焕, 苏 伟婷, LIN Chyi Chyang, 杨风堂. 2008.黑麂和费氏麂四种卫星 DNA 的克隆特征和染色体定位[J]. 动物学研究, 29 (3): 225-235.]
- Manceau M, Domingues VS, Mallarino R, Hoekstra HE. 2011. The developmental role of Agouti in color pattern evolution [J]. Science, 331(6020): 1062-1065.
- Matsunaga N, Virador V, Santis C, Vieira WD, Furumura M, Matsunaga J, Kobayashi N, Hearing VJ. 2000. *In situ* localization of agouti signal protein in murine skin using immunohistochemistry with an ASP-specific antibody [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 270(1): 176-182.
- Morgan H, Beck T, Blake A, Gates H, Adams N, Debouzy G, Leblanc S, Lengger C, Maier H, Melvin D, Meziane H, Richardson D, Wells S, White J, Wood J, EUMODIC Consortium, de Angelis MH, Brown SDM, Hancock JM, Mallon AM. 2010. EuroPhenome: a repository for high-throughput mouse phenotyping data [J]. *Nucleic Acids Res*, **38**(S1): D577-D585.
- Overton JD, Leibel RL. 2011. Mahoganoid and mahogany mutations rectify the obesity of the yellow mouse by effects on endosomal traffic of MC4R protein [J]. J Biol Chem, 286(21): 18914-18929.
- Price ER, Fischer DE. 2001. Sensorineural deafness and pigmentation genes: melanocytes and the *Mitf* transcriptional network [J]. *Neuron*, **30**(1): 15-18.

- Scattoni ML, Gandhy SU, Ricceri L, Crawley JN. 2008. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism [J]. *PLoS* One, 3(8): e3067.
- Spritz RA, Chiang PW, Oiso N, Alkhateeb A. 2003. Human and mouse disorders of pigmentation [J]. Curr Opin Genet Dev, 13(3): 284-289.
- Stottmann RW, Beier DR. 2010. Using ENU mutagenesis for phenotype-driven analysis of the mouse[J]. *Methods Enzymol*, 477: 329-348.
- Wahlsten D, Metten P, Crabbe JC. 2003. Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories reveals that BTBR T/+ *tf/tf* has severely reduced hippocampal commissure and absent corpus callosum [J]. *Brain Res*, 971(1): 47-54.
- Wilkinson P, Sengerova J, Matteoni R, Chen CK, Soulat G, Ureta-Vidal A, Fessele S, Hagn M, Massimi M, Pickford K, Butler RH, Marschall S, Mallon AM, Pickard A, Raspa M, Scavizzi F, Fray M, Larrigaldie V, Leyritz J, Birney E, Tocchini-Valentini GP, Brown S, Herault Y, Montoliu L, de Angelis MH, Smedley D. 2010. EMMA-mouse mutant resources for the international scientific community [J]. *Nucleic Acids Res*, **38**: D570-D576.
- Wu BJ, Mao HH, Shao YX, Xue ZF, Li HD. 2003a. Four kinds of ENU-induced white spot mice and chromosome locations of the mutant genes [J]. *Chin Sci Bull*, 48(24): 2658-2664.
- Wu BJ, Mao HH, Zhu H, Yan ZF, Yang L, Sun Q, Xu XM, Xue ZF, Li HD.
  2003b. PCR conditions and application of 39 mouse microsatellites [J].
  Acta Lab Anim Sci Sin, 11(4): 216-220. [吴宝金,茅薏华,朱洪, 阎志峰,杨玲,孙强,徐向明,薛整风,李厚达. 2003. 小鼠 39 个微卫星的 PCR 条件及其运用 [J]. 中国实验动物学报, 11(4): 216-220.]
- Wu BJ, Yin LJ, Lu ZL, Yin YS, Yang WW, Yang R, Kang XD, Liu GJ, Yin HP, Yu LP, Gu ME, Wu PL. 2010. Abnormal gonad development in *Kit<sup>W-2Bao</sup>* mice caused by a *Kit* gene missense mutation [J]. *Chin Sci Bull*, **55**(36): 4143-4149.
- Wu PL, Yin HP, Yin LJ, Zhu J, Zeng YM, Liu GJ, Kang XD, Yu LP, Gu ME, Yuan H, Wu BJ. 2009. Gonadial abnormality and homozygous decease from the nonsense mutation of Kit in W<sup>3Bao</sup> Mouse [J]. Zool Res, **30**(1): 45-52. [吴培林, 尹洪萍, 殷黎静, 朱洁, 曾咏梅, 刘桂杰, 亢晓冬, 俞利平, 顾美儿, 袁红, 吴宝金. 2009. Kit 无义突变致 W<sup>3Bao</sup> 小鼠生 殖腺异常及纯合子贫血死亡[J]. 动物学研究, **30**(1): 45-52.]